



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MARIA ISADORA GABRIEL SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO AGONISTA E ANTAGONISTA DE EXTRATOS
DE FOLHAS DE *OCHROMA PYRAMIDALE* (CAV. EX LAM.) URB. EM
RECEPTORES NUCLEARES.**

BRASÍLIA 2017

MARIA ISADORA GABRIEL SAMPAIO

Matrícula: 12/0018080

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO AGONISTA E ANTAGONISTA DE EXTRATOS
DE FOLHAS DE *OCHROMA PYRAMIDALE* (CAV. EX LAM.) URB. EM
RECEPTORES NUCLEARES.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
conclusão da graduação em Farmácia e título
de Bacharel em Farmácia, pela Universidade
de Brasília, junto a Faculdade de Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

BRASÍLIA 2017

Aos meus pais, especialmente à minha mãe,
ao meu irmão, à minha família e amigos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, que sempre esteve presente em minha vida me guiando nos momentos de insegurança e incertezas e por ter planejado, com muito zelo, cada detalhe. Agradeço, ainda a Deus, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais e meu irmão por todo apoio e estarem sempre ao meu lado, especialmente a minha mãe, Edna Maria, que sempre acreditou em mim; sentiu meus sofrimentos; acompanhou-me, domingo à noite, mesmo achando um absurdo, ao laboratório para finalizar meus experimentos; brigou para que eu parasse de procrastinar.

Agradeço imensamente aos meus professores, que mostraram que são pessoas normais como eu e foram mais que mestres, foram amigos. Em especial, ao professor Simeoni, meu pai científico, pelo voto de confiança e paciência que sempre teve comigo.

À minha família e amigos, por me mostrarem o quanto sou amada e por nunca esconderem o orgulho que sentem de mim. Espero ser merecedora de todo esse orgulho.

À família que a UnB me deu, pelos estudos em grupo na BCE; a vez que, ainda de madrugada, no escuro e no frio, fomos estudar química orgânica no “amarelinho”; as baladas; as brigas. Vocês fizeram esses cinco anos e meio muito mais felizes.

Agradeço a todos os meus colegas de turma, veteranos e calouros, serei uma farmacêutica para sempre realizada, por saber que terei colegas de profissão como vocês.

Aos amigos farmolíticos, minha eterna gratidão, por todos os ensinamentos passados, pelo incentivo e, principalmente, pela amizade.

Por fim agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para minha formação, funcionários, técnicos, secretários.

RESUMO

O gênero *Ochroma* pertence à família Malvaceae e costuma ser encontrada em áreas tropicais. O pau de balsa, como é conhecida a espécie *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., é uma espécie florestal nativa da Amazônia Ocidental. No Brasil ocorre naturalmente na Amazônia. É a madeira mais leve do mundo, o que a torna uma poderosa barreira acústica e térmica. É uma excelente opção na destinação da recomposição de áreas degradadas e da preservação permanente graças ao seu rápido crescimento e tolerância à luminosidade. Considerando que não há estudos em receptores nucleares dos extratos de *O. pyramidale*, foi feita a avaliação da possível ação agonista ou antagonista em alguns destes receptores. Segundo estudos, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-gama (PPAR γ) pode diminuir a progressão da aterosclerose e aumentar a sensibilidade à insulina, podendo ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo o diabetes mellitus do tipo 2 e dislipidemia. Outros estudos mostraram que o tratamento combinado de γ -tocotrienol com os antagonistas de PPAR γ , inibiu significativamente o crescimento de células de câncer de mama. Os hormônios estrogênicos influenciam o crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos alvos, como tecidos dos sistemas reprodutores femininos e masculinos tais como a glândula mamária, útero, vagina, ovário, testículos, epidídimo, e da próstata, sendo relacionado com o aparecimento de câncer nesses tecidos. Os resultados obtidos no ensaio de gene-repórter quanto à ativação dos receptores nucleares PPAR γ , ER α e ER β pela ação dos extratos de *O. pyramidale* não mostraram ação agonista significativa dos extratos nestes receptores. Entretanto, os resultados indicam uma ação antagonista dos extratos naqueles receptores.

Palavras-chave: *Ochroma pyramidale*, Pau de balsa, Receptores nucleares, PPAR γ , ER α , ER β .

ABSTRACT

Ochroma gender belongs to Malvaceae family, and it is commonly found in the tropical environment. *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., also known as Balsa Wood, is a forest specie native from western Amazon. It is the lightest wood in the world, which makes it a powerful thermal and acoustic barrier. It is an excellent option on recomposing degraded green lands and permanent preservation, thanks to its fast growth and luminosity tolerance. Considering that there are no studies of *O. pyramidale* extracts on nuclear receptors, an evaluation was made of an agonist or antagonist activity in some of these receptors. According to some studies, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) can decrease atherosclerosis progression and increase insulin sensibility, being a potential therapeutic target for the treatment of many diseases, including diabetes mellitus type 2 and dyslipidemia. Other researchers showed that combined γ -tocotrienol treatment with PPAR γ antagonists significantly inhibited breast cancer cells. The estrogen hormones influence the growth, distinction, and function of many target tissues, as females and males reproductive systems tissues, such as mammary gland, womb, vagina, ovaries, testicles, epididymis and prostate, being related to cancer appearance on these tissues. The obtained results on gene transcription regulation analysis and also the PPAR γ , ER α and ER β nuclear receptors activation by *O. pyramidale* extracts did not show significant agonist action of extracts on these receptors. Nonetheless, the results indicate an antagonist action of extracts on these receptors.

Keywords: *Ochroma pyramidale*, Balsa Wood, Nuclear Receptors, PPAR γ , ER α , ER β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folha de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.; Árvore de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. localizada no Campus Darcy Ribeiro, UnB.

Figura 2 – Ensaio da ação agonista por gene-repórter em células Hela transfetadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por sequências do ER α (**A**), ER β GAL (**B**) e PPAR γ GAL (**C**).

Figura 3 – Ensaio da ação antagonista por gene-repórter em células Hela transfetadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por sequências do ER α (**A**), ER β GAL (**B**) e PPAR γ GAL (**C**).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma.

PPRE – Elemento responsivo aos proliferadores de peroxissoma.

ER – Receptor de estrogênio.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose.

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio.

DMSO – dimetilsufóxido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>OCHROMA PYRAMIDALE</i>	15
2.2. CULTURA DE CÉLULAS.....	15
2.3. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	16
2.4. TRANSFECCÇÃO E ENSAIO DE GENE-REPÓRTER.....	17
2.5. ESTATÍSTICA.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÃO.....	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

As células-alvo respondem por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores, independentemente da natureza do sinal. Receptores são estruturas moleculares altamente especializadas, que têm no organismo afinidade para interagir com substâncias endógenas com função fisiológica ou compostos exógenos que tenham características químicas e estruturais, semelhantes aos que ocorrem naturalmente no organismo. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores específicos desencadeia vários processos metabólicos de respostas específicas dentro da célula-alvo (Franzotti, 2006).

De acordo com sua localização na célula, os receptores se dividem em dois grupos. O primeiro grupo de receptores é constituído por proteínas do tipo transmembrana que se localizam na superfície das células-alvo. Os receptores do tipo transmembrana são ativados por ligação de uma molécula sinalizadora específica e essa ligação desencadeia, por sua vez, a geração de uma cascata de sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula. O segundo grupo é formado por receptores localizados dentro das células, os receptores nucleares, e necessitam da entrada da molécula sinalizadora no citoplasma ou no núcleo para serem ativados. Após a ligação do complexo receptor-ligante interagir com sequências específicas no interior do núcleo, os receptores ativados desencadeiam suas ações (Franzotti, 2006).

Os receptores nucleares são alvos ideais para a descoberta de novos fármacos, não somente porque são mediadores em uma infinidade de processos biológicos e doenças, mas porque são regulados por pequenas moléculas lipofílicas que podem ser facilmente substituídas por um fármaco alternativo (Sladek, 2003).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares, relacionado a funções

metabólicas. Regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. São conhecidos três tipos de PPAR, codificados por genes distintos responsáveis pela expressão gênica quando ligados a elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPRE) localizados na região promotora de cada gene: PPAR alfa (PPAR α), PPAR beta (PPAR β) e PPAR gama (PPAR γ) (Tavares; Hirata; Hirata, 2007). O PPAR γ é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas, baço, tecido adiposo e macrófagos (Su; Cao; Huang *et al.*, 2017). Estudos sugerem que a ativação do PPAR γ pode diminuir a progressão da aterosclerose e aumentar a sensibilidade à insulina, podendo ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo o diabetes mellitus do tipo 2 e dislipidemia (Tavares; Hirata; Hirata, 2007).

Outros estudos mostraram que o tratamento combinado de γ -tocotrienol, membro da família da vitamina E que exibe potente atividade anticancerígena devido aos seus efeitos contra uma grande variedade de neoplasmas (Ling; Luk; Al-Ejeh *et al.*, 2012), com os antagonistas de PPAR γ , inibiu significativamente o crescimento de células de câncer de mama e este efeito foi associado com uma diminuição correspondente na atividade e expressão de PPAR γ . Por outro lado, o tratamento combinado de γ -tocotrienol com os agonistas de PPAR γ , rosiglitazona e troglitazona, estimulou o crescimento de células tumorais, e este efeito foi associado com um aumento na atividade e expressão de PPAR γ (Malaviya; Sylvester, 2014).

O receptor de estrogênio (ER) é um membro da superfamília de receptores nucleares capaz de transduzir sinais extracelulares (pequenas moléculas lipofílicas) em resposta transcricional (Mosselman; Polman; Dijkema, 1996). Os hormônios estrogênicos influenciam o crescimento, diferenciação e funcionamento de muitos tecidos alvos, como tecidos dos sistemas reprodutores femininos e masculinos tais como a glândula mamária,

útero, vagina, ovário, testículos, epidídimo, e da próstata. Os estrogênios desempenham também um papel importante na manutenção dos ossos, no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular em que os estrogênios têm certos efeitos cardioprotetores. Uma vez ativado por estrogênios, o ER sofre uma alteração conformacional permitindo que o receptor interaja com a cromatina e module a transcrição de genes alvo (Kuiper; Lemmen; Carlsson *et al.*, 1998).

Já foi observado que o crescimento de certos tumores, principalmente aqueles derivados dos órgãos reprodutivos (mama, próstata, endométrio, ovário), é regulado pelos hormônios esteroides (estrogênios e androgênios) (Eisenberg; Koifman, 2001). Atualmente, o câncer de mama é reconhecido como um grupo de doenças altamente heterogêneas e é classificado em três principais subtipos diferentes, baseados na expressão imuno-histoquímica de receptores: triplo negativo, onde não há presença de ER, receptor de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2); HER2+, onde há presença de HER2 e pode ou não haver presença de ER e PR; e ER+, onde a presença de ER é positiva, pode ou não haver presença de PR e não há presença de HER2 (Choi; Kim; Youn *et al.*, 2017). Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia ablativa desse hormônio tem produzido remissão clínica em pacientes com câncer de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto que os tumores que não respondem apresentam níveis baixos ou indetectáveis (Eisenberg; Koifman, 2001).

A utilização de plantas com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A natureza sempre atraiu a curiosidade do homem, não só por fornecer recursos para sua alimentação e manutenção, mas por todo o aprendizado e

inspiração que oferece (Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). O desafio de ultrapassar a mera sobrevivência e a busca incessante pela compreensão das leis naturais levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico que vemos hoje, medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, que não teriam sido possíveis sem a contribuição dos produtos naturais (Calixto, 2003). No Brasil muitas plantas são usadas com fins terapêuticos, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (Junior; Pinto; Maciel, 2005).

A espécie *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. - pertencente à família Malvaceae - é popularmente chamada de pau-de-balsa, pau-de-jangada ou simplesmente balsa, sendo anteriormente denominada de *Ochroma lagopus* Swartz (Rizzini, 1977 apud Netto, 1994). Ocorre no sul do México à Bolívia, Peru e Amazonas, frequente na sua metade ocidental. Está presente em matas primárias e secundárias e às margens dos rios igapós (Rizzini, 1978; Loureiro, 1979 apud Netto, 1994). Costuma ser encontrada em áreas tropicais. No Brasil são nativas, além da *Ochroma pyramidale*, as espécies *Bombacopsis glabra*, *Ceiba pentandra*, *Chorisia speciosa*, *Eriotheca candolleana*, *E. gracilipes*, *E. pubescens*, *Pachira aquatica* e *Pseudobombax grandiflorum* de cerca de 28 gêneros que esta família apresenta (Paula *et al.*, 1997).

A madeira do pau-de-balsa é muito leve, elástica e macia, sendo fácil de trabalhar (Lêdo, 1977; Loureiro, 1979; Rizzini, 1977 apud Netto, 1994). Pelas suas características é ideal para construir jangadas, balsas, salva-vidas, boias e brinquedos. A paina dos frutos (chamada kapok) pode ser usada no enchimento de almofadas e travesseiros (Rizzini, 1976 e 1977 apud Netto, 1994).

A *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. também se encontra entre as espécies arbóreas com potencialidade no uso para reflorestamento. Em consequência da baixa reposição, da crescente demanda por produtos e subprodutos, e da extinção de grandes

populações de espécies florestais, o reflorestamento de grandes áreas torna-se cada dia mais necessário (Pinto et al., 2004 apud Alvino; Rayol, 2007), e graças ao seu rápido crescimento e tolerância à luminosidade direta essa espécie é utilizada em plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente (Vasquez-Yanes, 1974 apud Alvino; Rayol, 2007).

Até aonde vai nosso conhecimento, poucos são os estudos quanto ao uso na medicina popular da *O. pyramidale*, sendo suas propriedades descritas como emoliente, emético, diurético, antidiarreico e expectorante (Cordero, 1978; Revilla, 2000). Considerando que não há estudos em receptores nucleares dos extratos de *O. pyramidale*, o objetivo principal deste estudo é a avaliação de possível ação agonista ou antagonista em alguns tipos de receptores nucleares, como o PPAR e ER.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos extratos de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.

Os experimentos foram feitos com extratos gentilmente fornecidos pela equipe do laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia da UnB sob a coordenação da professora Dra. Dâmaris Silveira. Foram fornecidos os extratos hexânico e etanólico de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.

O extrato aquoso de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. foi obtido por infusão, na proporção de 1:20 de planta e água, das folhas pulverizadas, seguido por centrifugação à 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se, assim, o extrato aquoso bruto da planta.

As folhas de *O. pyramidale* foram coletadas no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, em janeiro de 2015. A figura 1 mostra a folha e a árvore de *O. pyramidale*. O indivíduo é idêntico à exsicata depositada no Herbário da UnB (UB 8445), coletado por Taxonomy Class Universidade de Brasília 4. O material vegetal foi seco à temperatura ambiente e pulverizado (Figura 1).



Figura 1 – Folha de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.; Árvore de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. localizada no Campus Darcy Ribeiro, UnB. Fotos da autora.

2.2. Cultura de células

Células de carcinoma de colo de útero (HeLa) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino em

placas de cultura de 15 cm em incubadora a 37°C/5% CO₂. As células estavam aptas aos testes após atingirem uma confluência de 80% da placa.

2.3. Ensaios de viabilidade celular

Com o objetivo de definir a viabilidade das células HeLa expostas ao tratamento com os extratos preparados, foi utilizado o ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT possui uma coloração amarela e é reduzido por enzimas oxidorreduções celulares, presentes no citosol das células, para sua forma insolúvel, de cor purpura. Ou seja, o MTT é reduzido em cristais de formazan em células metabolicamente viáveis, vivas.

Os extratos hexânico e etanólico foram diluídos em DMSO. A seguir foram feitas soluções em várias concentrações para o ensaio de MTT. As concentrações em que a viabilidade foi igual ou superior a 70% foram consideradas aptas ao ensaio seguinte de gene-repórter. As concentrações foram testadas em um intervalo de 10 µg/mL a 100 µg/mL para o extrato hexânico, 10 µg/mL a 150 µg/mL para o extrato etanólico e 10 µg/mL a 250 µg/mL para o extrato aquoso.

A viabilidade celular foi calculada da seguinte maneira: a absorbância do controle positivo é normalizada a 100%. A viabilidade com os extratos é relativa aos 100% do controle.

Os ensaios de MTT foram realizados em placas de 96 poços, contendo 30.000 células/poço em 50 µL de meio DMEM/poço. Para a contagem de células, utilizou-se a Câmara de Neubauer, tendo sido feita a contagem nos quatro quadrantes. Antes da colocação do tratamento, as placas foram colocadas numa incubadora a 37°C / 5% CO₂ por 24 horas para que as células aderissem à placa. Passadas 24h foram adicionados, em cada poço, 50 µL da solução de tratamento nas concentrações determinadas, totalizando o volume de 100 µL/poço.

A viabilidade celular foi avaliada após 24h de tratamento. Após este tempo, o meio com tratamento foi aspirado e foi adicionado 50 µL de MTT (Sigma) em cada poço, na concentração de 5 mg/mL, diluído em meio DMEM. As placas foram, então, incubadas por 4h a 37°C/5% CO₂. Em seguida, foram adicionados 150µL de isopropanol acidificado (26mL de isopropanol e 104 µL de HCl), chamada esta de solução reveladora. Os cristais de formazan foram homogeneizados até a dissolução e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Foram usados como controle positivo um poço contendo células e meio DMEM e como controle negativo um poço contendo células e DMSO (dimetilsufóxido), o qual foi veículo para os extratos.

2.4. Transfecção e Ensaio de Gene-Repórter

Tecnologia de gene repórter é amplamente utilizada para monitorizar os eventos celulares associados com a transdução de sinal e a expressão do gene. A principal vantagem destes ensaios é a sua elevada sensibilidade, conveniência e adaptabilidade para medições de grande escala (Naylor, 1999). O ensaio de gene-repórter foi feito com o objetivo de testar a possível ação agonista ou antagonista dos extratos nos receptores PPAR γ , ER α e ER β .

Foi utilizada uma placa de 48 poços, sendo colocadas 50.000 células por poço em 250 µL de meio DMEM por poço. A placa foi incubada por 24h para que as células aderissem e, então, de forma separada, foi realizada a transfecção com lipofectamina de plasmídeos constituídos por sequências do PPAR γ GAL, ER α e ER β GAL, contendo o elemento responsivo de cada plasmídeo (GAL Luc, ERE e GAL Luc, respectivamente), associados ao gene da luciferase, conforme o protocolo do fabricante. Esperadas 6h após a transfecção, o meio contendo lipofectamina foi aspirado e foram colocadas nos poços que continham as células transfectadas as concentrações determinadas de cada extrato para avaliar o efeito destas doses sobre a ativação dos receptores. Como controle positivo,

foram usados β -estradiol (10^{-7} M), para ER α e ER β , e rosiglitazona (10^{-7} M), para PPAR γ . Após 20-24h de tratamento, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 50 μ L do tampão de lise em cada poço, levando ao vórtex por 1 minuto. Foram transferidos 10 μ L do lisado de cada poço para um microtubo e acrescentado 20 μ L de luciferina para leitura no luminômetro.

2.5. Estatística

Os dados encontrados foram plotados no GraphPadPrism® versão 5.0 usando a análise de variância One-way ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações encontradas no ensaio de MTT, que proporcionaram uma viabilidade celular igual ou superior a 70% e que foram usadas posteriormente nos ensaios de gene-repórter foram: extrato hexânico 100 µg/mL, extrato etanólico 60 µg/mL e extrato aquoso 250 µg/mL.

Os resultados obtidos no ensaio de gene-repórter quanto à ativação dos receptores nucleares ER α , ER β e PPAR γ não mostraram ação agonista significativa dos extratos nestes receptores (Figura 2).

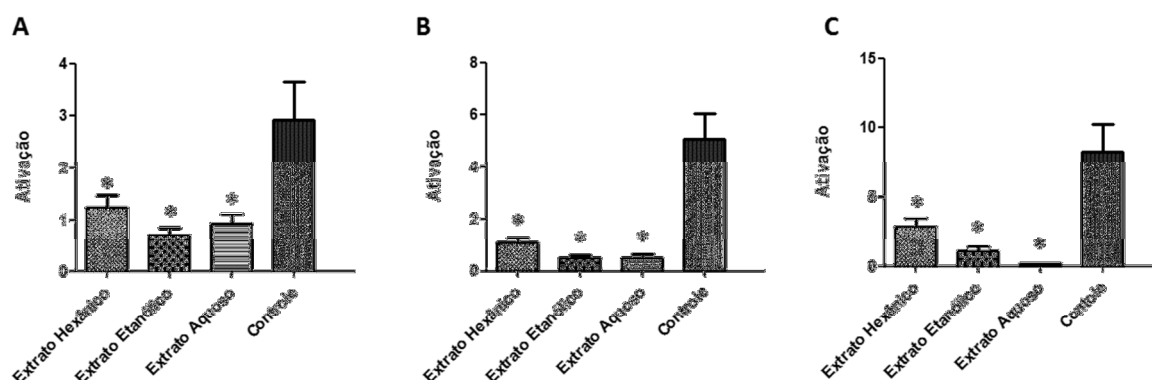


Figura 2 – Ensaio da ação agonista por gene-repórter em células HeLa transfectadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por sequências do ER α (A), ER β GAL (B) e PPAR γ GAL (C). Os extratos foram adicionados nas seguintes concentrações: extrato hexânico (100µg/mL), extrato etanólico (60µg/mL) e extrato aquoso (250µg/mL). Controles positivos: β -estradiol (10^{-7} M) para ER α e ER β , e rosiglitazona (10^{-7} M) para PPAR γ . Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle.

Entretanto, os extratos tiveram ação antagonista naqueles receptores quando adicionados às células na presença de agonistas [controles positivos β -estradiol (10^{-7} M) e rosiglitazona (10^{-7} M)]. A ativação do receptor ER α pelo β -estradiol (10^{-7} M) na presença dos extratos diminuiu 4,5% com o extrato hexânico, 74% com o etanólico e 88% com o extrato aquoso (Figura 3A). Em ER β a ativação do extrato hexânico diminuiu 44,16% em comparação com o controle [β -estradiol (10^{-7} M)], o extrato etanólico diminuiu 67,8%, e o

extrato aquoso diminuiu 91,7% (Figura 3B). No receptor nuclear PPAR γ a ativação do controle positivo rosiglitazona (10^{-7} M) foi diminuída na presença do extrato hexânico em 67,6%, na presença do extrato etanólico 40,2% e na presença do extrato aquoso 98% (Figura 3C).

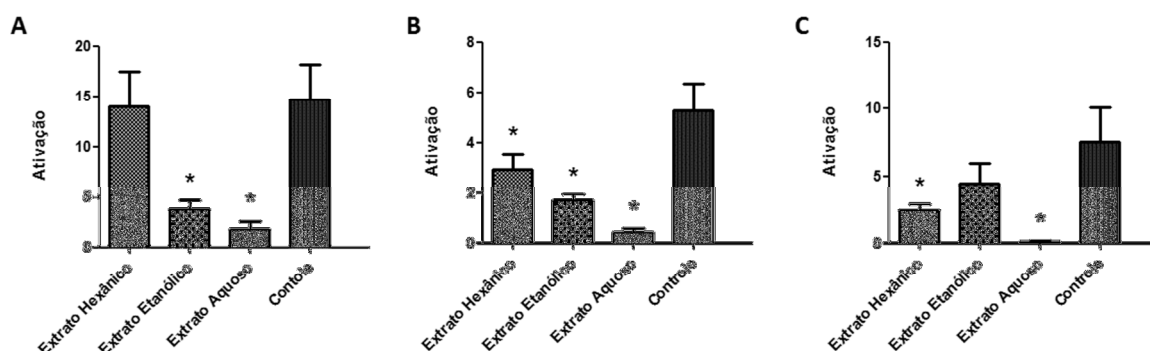


Figura 3 – Ensaio da ação antagonista por gene-repórter em células HeLa transfectadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por sequências do ER α (A), ER β GAL (B) e PPAR γ GAL (C). Os extratos foram adicionados nas seguintes concentrações: extrato hexânico (100 μ g/mL), extrato etanólico (60 μ g/mL) e extrato aquoso (250 μ g/mL) às células na presença dos agonistas (controles positivos). Controles positivos: β -estradiol (10^{-7} M) para ER α e ER β , e rosiglitazona (10^{-7} M) para PPAR γ . Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que não há ação agonista dos extratos nos receptores estudados, entretanto, os testes para estudo da ação antagonista sugerem que o extrato hexânico teve ação antagonista no receptor PPAR γ e seletiva para o receptor ER, sendo ativo apenas no ER β . Os extratos etanólico e aquoso tiveram ação antagonista nos receptores PPAR γ , ER α e ER β .

Estes resultados sugerem que os extratos, mesmo tendo características diferentes, possuem moléculas que têm ação antagonista nos receptores nucleares estudados, provavelmente são moléculas (ou grupo de moléculas) diferentes para a ação antagonista.

Estes resultados são inéditos para extratos de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., e devem ser aprofundados para melhor explicação da ação antagonista e futuros desenvolvimentos de possíveis moléculas que possam chegar a ter ação farmacológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVINO, F. O.; RAYOL, B. P. Efeito de diferentes substratos na germinação de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.(Bombacaceae). *Ciência Florestal*, 17, (1): 71-75, 2007.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, 55, (3): 37-39, 2003.
- CHOI, Y.; KIM, S. H.; YOUN, I. K. *et al.* Rim sign and histogram analysis of apparent diffusion coefficient values on diffusion-weighted MRI in triple-negative breast cancer: Comparison with ER-positive subtype. *PloS one*, 12, (5): e0177903, 2017.
- CORDERO, A.B. “Manual de medicina doméstica: plantas medicinales dominicanas.” ed. Universidad Autónoma de Santo Domingo, 1978.
- EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol*, 47, (4): 377-388, 2001.
- FRANZOTTI, E. M. *Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: Morus nigra L., Plectranthus ornatus Codd., Ipomoea cairica (L) Sweet e Pouteria torta (Mart.) Radlk.* Doutorado - Universidade de Brasília, 2006.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. *Química nova*, 28, (3): 519-528, 2005.
- KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139, (10): 4252-4263, 1998.
- LING, M. T.; LUK, S. U.; AL-EJEH, F. *et al.* Tocotrienol as a potential anticancer agent. *Carcinogenesis*, 33, (2): 233-239, 2012.

MALAVIYA, A.; SYLVESTER, P. W. Synergistic Antiproliferative Effects of Combined γ -Tocotrienol and PPAR γ Antagonist Treatment Are Mediated through PPAR γ -Independent Mechanisms in Breast Cancer Cells. *PPAR research*, 2014, 2014.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*, 392, (1): 49-53, 1996.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical pharmacology*, 58, (5): 749-757, 1999.

NETTO, D. A. M. Germinacao de sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* (Cav.) Urb.)-Bombacaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Vol. 16, n $^{\circ}$. 2: p.159-162, 1994.

PAULA, V.F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; PILO-VELOSO, D. "The chemistry of the bombacaceae family." *Química Nova*, 20(6): 627-630, 1997.

REVILLA, J. "Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis." 2000.

SLADEK, F. M. Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. *Expert opinion on therapeutic targets*, 7, (5): 679-684, 2003.

SU, M.; CAO, J.; HUANG, J. *et al.* The In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Effects of a Phthalimide PPAR- γ Agonist. *Marine Drugs*, 15, (1): 7, 2017.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arq. bras. endocrinol. metab*, 51, (4): 526-533, 2007.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29, (2): 326-337, 2006.